

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 0 7 K 7/08 16/18	ZNA	C 0 7 K 7/08 16/18	4 B 0 6 4 4 C 0 8 4
C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 5
G 0 1 N 33/53 33/577		G 0 1 N 33/53 33/577	D A 4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 9 数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000－328981(P2000－328981)	(71)出願人 500466739 財団法人奈良先端科学技術大学院大学支援財団 奈良県生駒市高山町8916番地12
(22)出願日 平成12年10月27日(2000.10.27)	(72)発明者 谷原 正夫 奈良県生駒市高山町8916－5 大学宿舍A－206
特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年9月26日 日本免疫学会発行の「日本免疫学会総会・学術集会記録 第30巻」に発表	(74)代理人 100062144 弁理士 青山 葆 (外1名)
最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 アポトーシス抑制ペプチド

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 新規なTNF等の阻害活性を有するペプチド並びにその薬学的に許容される塩を与え、TNF等が誘導するアポトーシスや炎症等を阻害し、これが原因となる疾患の治療に有用なペプチド並びにその薬学的に許容される塩の提供。

【解決手段】 ヒト由来の下記のアミノ酸配列：His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Thr Gly Gln (配列番号：1)

Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu (配列番号：2)

Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu (配列番号：3)

のいずれか、或いは当該アミノ酸配列に1～3個の任意のアミノ酸が付加された配列、当該アミノ酸配列から1～3個のアミノ酸が欠失した配列、又は当該アミノ酸配列において相同性置換された配列を含むペプチドであっ

て、アポトーシス又は炎症の誘導を阻害するペプチド並びにその薬学的に許容される塩。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記のアミノ酸配列：

His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Thr Gly Gln(配列番号：1)

Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu(配列番号：2)

Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu(配列番号：3)

のいずれか、あるいは当該アミノ酸配列に1～3個の任意のアミノ酸が付加された配列、当該アミノ酸配列から1～3個のアミノ酸が欠失した配列、または当該アミノ酸配列において相同性置換された配列を含むペプチドであって、アポトーシスまたは炎症の誘導を阻害するペプチドならびにその薬学的に許容される塩。

【請求項2】 下記のアミノ酸配列：His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Thr Gly Gln(配列番号：1)、当該アミノ酸配列に1～3個の任意のアミノ酸が付加された配列、当該アミノ酸配列から1～3個のアミノ酸が欠失した配列、または当該アミノ酸配列において相同性置換された配列を含むペプチドであって、TNFによるアポトーシスまたは炎症の誘導を阻害するペプチドならびにその薬学的に許容される塩。

【請求項3】 下記のアミノ酸配列：Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu(配列番号：2)、当該アミノ酸配列に1～3個の任意のアミノ酸が付加された配列、当該アミノ酸配列から1～3個のアミノ酸が欠失した配列、または当該アミノ酸配列において相同性置換された配列を含むペプチドであって、TRAILによるアポトーシスまたは炎症の誘導を阻害するペプチドならびにその薬学的に許容される塩。

【請求項4】 下記のアミノ酸配列：Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu(配列番号：3)、当該アミノ酸配列に1～3個の任意のアミノ酸が付加された配列、当該アミノ酸配列から1～3個のアミノ酸が欠失した配列、または当該アミノ酸配列において相同性置換された配列を含むペプチドであって、FasLによるアポトーシスまたは炎症の誘導を阻害するペプチドならびにその薬学的に許容される塩。

【請求項5】 当該アミノ酸配列のアミノ末端がアセチル基、メトキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基、1～5残基のペプチドで置換された、請求項1から4のいずれかに記載のペプチドならびにその薬学的に許容される塩。

【請求項6】 当該アミノ酸配列のカルボキシ末端がアミド基、メチルエステル基、ブチルエステル基、1～5残基のペプチドで置換された、請求項1から4のいずれかに記載のペプチドならびにその薬学的に許容される塩。

【請求項7】 酸と共に形成される、請求項1から4のいずれかに記載の薬学的に許容されるペプチドの塩。

【請求項8】 当該酸が、塩酸、硫酸、燐酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、パルミチン酸である、請求項7に記載の薬学的に許容されるペプチドの塩。

【請求項9】 アルカリ金属またはアルカリ土類金属の水酸化物または炭酸塩と共に形成される、請求項1から4のいずれかに記載の薬学的に許容されるペプチドの塩。

【請求項10】 当該アルカリ金属またはアルカリ土類金属が、ナトリウム、カリウム、カルシウムである、請求項10に記載の薬学的に許容されるペプチドの塩。

【請求項11】 アルミニウムの水酸化物または炭酸塩と共に形成される、請求項1から4のいずれかに記載の薬学的に許容されるペプチドの塩。

【請求項12】 トリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、トープチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニンと共に形成される、請求項1から4のいずれかに記載の薬学的に許容されるペプチドの塩。

【請求項13】 全身性エリテマトーデス、橋本病、慢性関節リウマチ、移植片対宿主病、シェーグレン症候群、悪性貧血、アジソン病、強皮症、グッドパスチャー症候群、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、自然不妊、重症筋無力症、多発性硬化症、バセドー病、特発性血小板減少性紫斑病、インスリン依存性糖尿病などの自己免疫疾患；アレルギー；アトピー；動脈硬化症；心筋炎；心筋症；糸球体腎炎；再生不良性貧血；劇症肝炎、慢性肝炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎等の肝炎；AIDS；臓器移植後の拒絶反応；敗血症ショック；うっ血性心不全；脊髄異形成症候群；癌の治療に有用な請求項1から12のいずれかに記載のペプチドならびにその薬学的に許容される塩。

【請求項14】 請求項1から13のいずれかに記載のペプチドならびにその薬学的に許容される塩を抗原として特異的に認識する抗体。

【請求項15】 モノクローナル抗体である、請求項14に記載の抗体。

【請求項16】 用いられる抗体が請求項14および15に記載の抗体である、免疫検定方法。

【請求項17】 酵素免疫検定法、放射性免疫検定法、蛍光免疫検定法のいずれかが選択される、請求項16に記載の免疫検定方法。

【請求項18】 全身性エリテマトーデス、橋本病、慢性関節リウマチ、移植片対宿主病、シェーグレン症候群、悪性貧血、アジソン病、強皮症、グッドパスチャー症候群、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、自然不妊、重症筋無力症、多発性硬化症、バセドー病、特発性血小板減少性紫斑病、インスリン依存性糖尿病などの自己免疫疾患；アレルギー；アトピー；動脈硬化症；心筋炎；心筋症；糸球体腎炎；再生不良性貧血；劇症肝炎、

慢性肝炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎等の肝炎；AIDS；臓器移植後の拒絶反応；敗血症ショック；うっ血性心不全；脊髄異形成症候群；癌の診断または治療において用いられる、請求項1から12のいずれかに記載のペプチドならびにその薬学的に許容される塩を抗原として特異的に認識する抗体。

【請求項19】 モノクローナル抗体である、請求項18に記載の抗体。

【請求項20】 用いられる抗体が請求項18および19に記載の抗体である、免疫検定方法。

【請求項21】 酵素免疫検定法、放射性免疫検定法、蛍光免疫検定法のいずれかを選択される、請求項20に記載の免疫検定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新規なTNF、TRAIL、FasL阻害活性を有するペプチドならびにその生理学的に許容される塩に関する。さらに詳しくは、本発明はTNF、TRAIL、FasLが誘導するアポトーシスや炎症等を阻害し、これが原因となる全身性エリテマトーデス、橋本病、慢性関節リウマチ、移植片対宿主病、シェーグレン症候群、悪性貧血、アジソン病、強皮症、グッドパスチャー症候群、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、自然不妊、重症筋無力症、多発性硬化症、パセドー病、特発性血小板減少性紫斑病、インスリン依存性糖尿病などの自己免疫疾患；アレルギー；アトピー；動脈硬化症；心筋炎；心筋症；糸球体腎炎；再生不良性貧血；劇症肝炎、慢性肝炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎等の肝炎；AIDS；臓器移植後の拒絶反応；敗血症ショック；うっ血性心不全；脊髄異形成症候群；癌などの治療に有用なペプチドならびにその薬学的に許容される塩に関する。

【0002】

【従来の技術】アポトーシスは生体の恒常性を保つために必要な自然死であり、その破綻は癌や自己免疫疾患などの重篤な疾患を招く(Annu Rev Immunol, 17, 221-253, 1999)。アポトーシスは放射線や薬剤などの外因によっても引き起されるが、内因性の誘導因子としてTNF、TRAIL、FasL等が報告されている(Pharm Acta Helv, 74, 281-286, 2000; Exp Cell Res, 256, 58-66, 2000)。これらは、標的細胞上のそれぞれに特異的な受容体と結合し、アポトーシスを誘導する(TIBS, 24 February, 47-53, 1999)。

【0003】一方でTNF、TRAIL、FasLの過剰産生は、リウマチ性関節炎(Rheumatoid arthritis)、多発性硬化症(Multiple sclerosis)、AIDS(Acquired immune deficiency syndrome)、癌、敗血症ショック(Septic shock)、うっ血性心不全(Congestive heart failure)、再生不良性貧血(Aplastic anemia)、脊髄異形成症候群(Myelodysplastic syndrome)、クローン病(Crohn's disease)等の疾

患の原因となる(Microsc Res Tech, 50, 229-235, 2000)。

【0004】FasLに特異的に反応するヒト型化免疫グロブリンが知られており、アポトーシスに代表されるFasLとFasとの生理的反応を抑制することが示されている(WO 98/10070)。

【0005】Fas/FasL系の異常に起因する疾患の治療剤として有用な、抗Fas抗体を有効成分として含有する新規医薬組成物が知られている(特開2000-169393)。

【0006】Caspase-8と結合しDeath effector domainを持たない蛋白質が、アポトーシス制御能を有することが知られている(特開2000-226400)。

【0007】Fasの細胞内ドメインに結合するMORT-1、あるいはTRADDに結合して、FasLまたはTNFの効果をモジュレートする蛋白質、さらにはその活性を阻害するペプチドが知られている(特表平11-509422)。

【0008】上皮細胞増殖因子(EGF)を有効成分とする、細胞障害性T細胞上のFasLと臓器細胞膜上のFasとの相互作用によって惹起されるアポトーシスの抑制剤または予防剤が知られている(特開平10-194988)。

【0009】天然のTNF結合蛋白のTNF結合機能部分を探索して得られた合成ペプチドが知られており、マウスL-M細胞に対するTNFの細胞毒性を阻害することが示されている(特開平5-194594)。

【0010】トリアゼピンまたはジアゼピンからなる7員環と2乃至4個の窒素原子を含む5員環との縮合環化合物であることを特徴とするアポトーシス抑制剤が知られている(特開平11-228576)。

【0011】抗体に代表されるアポトーシス阻害剤は、特異性は高いが分子量が大きい蛋白質であるので、抗原性、投与方法、安定性に問題がある。天然のTNF結合蛋白のTNF結合機能部分を探索して得られた合成ペプチドは、天然のTNF結合蛋白との競合による有効性の低下、血液中の滞留時間が短いこと等の問題がある。また、低分子有機化合物のアポトーシス阻害剤は、アポトーシスの基本経路を阻害するので、選択性が低いことによる副作用が問題である。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】しかるに本発明は、新規なTNF、TRAIL、FasL阻害活性を有するペプチドならびにその薬学的に許容される塩を与え、さらにはTNF、TRAIL、FasLが誘導するアポトーシスや炎症等を阻害し、これが原因となる全身性エリテマトーデス、橋本病、慢性関節リウマチ、移植片対宿主病、シェーグレン症候群、悪性貧血、アジソン病、強皮症、グッドパスチャー症候群、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、自然不妊、重症筋無力症、多発性硬化症、パセドー病、特発性血小板減少性紫斑病、インスリン依存性糖尿病などの自

己免疫疾患；アレルギー；アトピー；動脈硬化症；心筋炎；心筋症；糸球体腎炎；再生不良性貧血；劇症肝炎、慢性肝炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎等の肝炎；AIDS；臓器移植後の拒絶反応；敗血症ショック；うつ血性心不全；脊髄異形成症候群；癌などの治療に有用なペプチドならびにその薬学的に許容される塩を与えることを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、上記の目的は、下記のアミノ酸配列(1)： His Cys Leu SerCys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Thr Gly Gln(配列番号：1)で表される配列を含むTN F阻害活性を有するペプチドならびにその薬学的に許容される塩、ならびに下記のアミノ酸配列(2)： Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly GluVal Glu (配列番号：2)で表されるTRAIL阻害活性を有するペプチドならびにその生理学的に許容される塩、ならびに下記のアミノ酸配列(3)： Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu(配列番号：3)で表されるFasL阻害活性を有するペプチドならびにその薬学的に許容される塩により達成される。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明においては各種アミノ酸残基を次の略号で記述する。

Ala : L-アラニン残基

Arg : L-アルギニン残基

Asn : L-アスパラギン残基

Asp : L-アスパラギン酸残基

Cys : L-システイン残基

Gln : L-グルタミン残基

Glu : L-グルタミン酸残基

Gly : グリシン残基

His : L-ヒスチジン残基

Ile : L-イソロイシン残基

Leu : L-ロイシン残基

Lys : L-リジン残基

Met : L-メチオニン残基

Phe : L-フェニルアラニン残基

Pro : L-プロリン残基

Ser : L-セリン残基

Thr : L-トレオニン残基

Trp : L-トリプトファン残基

Tyr : L-チロシン残基

Val : L-バリン残基

【0015】また、本明細書においては、常法に従ってペプチドのアミノ酸配列を、そのN末端のアミノ酸残基が左側に位置し、C末端のアミノ酸残基が右側に位置するように記述する。

【0016】本発明のペプチドは、通常のペプチド合成方法により行われる。例えば固相合成法または液相合成

法によって調製されるが、固相合成法が操作上簡便である〔例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座2 タンパク質の化学(下)」(昭和62年5月20日 株式会社東京化学同人発行)、第641-694頁参照〕。

【0017】本発明のペプチドの固相合成法による調製は、例えば、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体などの反応溶媒に不溶性である重合体に目的とするペプチドのC末端に対応するアミノ酸をそれが有する α -COOH基を介して結合させ、次いで該アミノ酸に目的とするペプチドのN末端の方向に向かって、対応するアミノ酸またはペプチド断片を該アミノ酸またはペプチド断片が有する α -COOH基以外の α -アミノ基などの官能基を保護したうえで縮合させて結合させる操作と、該結合したアミノ酸またはペプチド断片における α -アミノ基などのペプチド結合を形成するアミノ基が有する保護基を除去する操作とを順次繰り返すことによってペプチド鎖を伸長させ、目的とするペプチドに対応するペプチド鎖を形成し、次いで該ペプチド鎖を重合体から脱離させ、かつ保護されている官能基から保護基を除去することにより目的とするペプチドを得、次いでこれを精製することによって実施される。ここで、ペプチド鎖の重合体からの脱離および保護基の除去は、トリフルオロ酢酸を用いて同時に行うのが副反応を抑制する観点から好ましい。また、得られたペプチドの精製は逆相液体クロマトグラフィーやゲルパーミエーションクロマトグラフィーで行うのが効果的である。

【0018】また、本発明のペプチドの塩は、通常の塩生成反応を利用することにより調製される。

【0019】本発明により提供されるペプチドのアミノ酸配列は、

(1)： His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Thr Gly Gln(配列番号：1)、

(2)： Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu(配列番号：2)、

(3)： Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu(配列番号：3)で与えられる。

【0020】本発明のペプチドは、前記配列番号1～3のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むものであり、アミノ末端がアセチル基、メトキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基、1～5残基のペプチド等で置換されたものでも良く、カルボキシ末端がアミド基、メチルエステル基、ブチルエステル基、1～5残基のペプチド等で置換されたものでも良い。また、各アミノ酸残基は側鎖官能基の性質に基づく相同性置換がなされたものでも良い。例えば、LeuはIle、Valに、SerはThrに、GluはAspに、GlnはAsnに、LysはArgにそれぞれ置換可能であり、その逆も置換可能である。さらに、前記配列番号1～3のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸残基が、好ましくは1もしくは2個のアミノ酸残基が、さらに好ましくは1個のアミノ酸残基が、付加

されても良く、また、1～3個のアミノ酸残基が、好ましくは1もしくは2個のアミノ酸残基が、さらに好ましくは1個のアミノ酸残基が、欠失してもよい。その場合であっても、アポトーシスまたは炎症の誘導は阻害される。

【0021】本発明のペプチドは、薬学的に許容される塩を形成していても良く、その塩としては、例えば、塩酸、硫酸、燐酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、パルミチン酸などの酸との塩；ナトリウム、カリウム、カルシウムなどのアルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の、またはアルミニウムの水酸化物または炭酸塩との塩；トリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、 γ -ブチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニンなどとの塩などが挙げられる。

【0022】本発明のペプチドのTNF、TRAIL、FasL阻害効果は、通常のこれらの活性を測定する方法により行われる。例えば、TNFの活性は(1)マウスL細胞を標的とする細胞障害活性、(2)リポプロテインリパーゼの抑制活性、(3)線維芽細胞に対する増殖促進活性を測定して

行われる〔例えば、中嶋暉躬他編 新基礎生化学実験法 6 「生物活性を用いる測定法」(昭和63年4月30日 丸善株式会社発行)、第267～272頁参照〕。また、TNFの活性はマウスL929細胞やNIH3T3細胞に対するアポトーシス誘導で測定できる。TRAILの活性はマウスL929細胞に対するアポトーシス誘導で測定できる。FasLの活性はFas遺伝子を導入したマウスL929細胞やNIH3T3細胞に対するアポトーシス誘導で測定できる(例えば、EMBO J, 13, 4587-4596, 1994. 参照)。アポトーシス誘導の検出は、ヨウ化プロピディウム(PI)やヘキスト33258等の核酸染色試薬や、蛍光標識アネキシンVなどの膜構造の変化を検出する方法が好ましく用いられる。中でもヨウ化プロピディウム(PI)、FITC標識アネキシンVが特に好ましい。

【0023】本発明のペプチドを用いる治療法は、例えば静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、経口投与などの全身的投与や、関節内投与などのように疾患部位にカテーテルや注射針を用いて本発明のペプチドを注入する方法などが挙げられる。

【0024】本発明のペプチドの有効な活性発現のための投与量は、通常0.01 μ g/kg～2g/kg(成人)であり、好ましくは0.01 μ g/kg～200mg/kg(成人)である。

【0025】投与形態としてはペプチドを5%ブドウ糖液や生理食塩水などの薬学的に許容し得る溶液に溶解させて得られる溶液が好ましく、また該溶液は薬理学的に許容される種々の添加剤を含んでいてもよい。さらにペプチド類をカプセル化またはリポソーム化することも可能である。

【0026】抗体の作成種々の宿主動物に、配列番号：1、配列番号：2および／または配列番号3で示すアミノ酸配列を含む本発明のペプチドを含む組成物を注射することによって免疫することが出来る。宿主動物には、ウサギ、マウス、モルモット、ラット、ヒツジ、ヤギなどが含まれる。種々のアジュバントを宿主種に応じて免疫応答を増強させるために使用することが出来、その例として、フロイント(完全又は不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような表面活性物質、プルロニックポリオール類、ポリアニオン類、ペプチド類、油エマルジョン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、ジニトロフェノール及びBCG(無菌化ウシ型結核菌)やコリネバクテリウム・パルブムのような潜在的に有用なヒトアジュバントなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0027】抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、Fab発現ライブラリーを使用して生産された分子などが含まれる。

【0028】特定の抗原に対する抗体の均一な集合であるモノクローナル抗体は、上記したペプチドを使用し、標準のハイブリドーマ技術(コーラーら：Nature, 256: 495, 1975; コーラーら：Eur. J. Immunol., 6:511, 1976; コーラーら：Eur. J. Immunol., 6:292, 1976; ハマーリングら：In: Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, NY, 1981; アメリカ特許4,376,110; コスボアラ：Immunology Today, 4:72, 1983; コールら：Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80:2026, 1983; コールら：Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1983)を採用することによって、調製することが出来る。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びそれらのサブクラスを含む、任意のイムノグロブリンのクラスから選択することが出来る。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、イン・ビトロまたはイン・ビボのいずれで培養されてもよい。

【0029】抗体は、例えば診断的検定の部分として生物学的試料中の抗原の存在を検出するために使用することが出来る、また、他の治療の方法による医療的処置効果の評価のために使用することも出来る。

【0030】免疫検定法

更なる本発明の実施態様は、配列番号：1、配列番号：2および／または配列番号3で示すアミノ酸配列を含む本発明のペプチドを抗原として特異的に認識する抗体を用いる免疫検定法の分野に関連する。

【0031】当該抗原として特異的に認識される配列番号：1、配列番号：2および／または配列番号3で示すアミノ酸配列を含むペプチドは、所望により、アミノ末端がアセチル基、メトキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基、1～5残基のペプチド等で置換されたもので

も良く、カルボキシ末端がアミド基、メチルエステル基、ブチルエステル基、1～5残基のペプチド等で置換されたものでも良い。また、各アミノ酸残基は側鎖官能基の性質に基づく相同性置換がなされたものでも良い。

例えば、LeuはIle、Valに、SerはThrに、GluはAspに、GlnはAsnに、LysはArgにそれぞれ置換可能であり、その逆も置換可能である。さらに、前記配列番号1～3のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1～3個のアミノ酸残基が、好ましくは1もしくは2個のアミノ酸残基が、さらに好ましくは1個のアミノ酸残基が、付加されても良く、また、1～3個のアミノ酸残基が、好ましくは1もしくは2個のアミノ酸残基が、さらに好ましくは1個のアミノ酸残基が、欠失してもよい。その場合であっても、アポトーシスまたは炎症の誘導は阻害される。

【0032】さらに、当該ペプチドは、薬学的に許容される塩を形成していても良く、その塩としては、例えば、塩酸、硫酸、燐酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、パルミチン酸などの酸との塩；ナトリウム、カリウム、カルシウムなどのアルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の、またはアルミニウムの水酸化物または炭酸塩との塩；トリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、*t*-ブチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニンなどとの塩などが挙げられる。

【0033】1つの実施態様において、免疫検定法は、酵素結合免疫測定法(ELISA)である。この型では、サンプルおよび所定の試薬は、マイクロタイターウェルプレートのウェル内に含まれ、検定は、酵素標識の検出に適当な検出試薬をウェルに加えることにより開始される。当該検定は、当業者に既知であり、当該免疫検定法の技術に関連する背景情報は、'The Immunoassay Handbook', (Wild, D. G. Ed, Stockton Press, New York, [1994])に見ることができる。

【0034】適当な典型的な酵素標識には、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビのペルオキシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよびグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼが含まれるが、これらに限らない。ワサビのペルオキシダーゼが、本発明の酵素免疫検定法の使用に特に好ましい酵素標識である。

【0035】更に異なる実施態様では、免疫検定法は、放射性免疫検定法であり、本発明のアッセイ法の使用に適当な放射性同位元素には、トリチウムのような β -放射する同位元素およびオージェ電子を放射するヨウ素-125が含まれる。

【0036】また、更に異なる実施態様では、免疫検定法は、蛍光免疫検定法であり、適当な蛍光標識は、フルオレセイン、ローダミンおよびシアニン色素から選択される。

【0037】実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

(実施例1)

式(1)： His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Thr Gly Gln(配列番号：1)で示されるアミノ酸配列を含むペプチドHis Cys Leu Ser Cys Ser LysCys Arg Lys Glu Thr Gly Gln-NH₂をペプチド自動合成装置を用いて固相合成法により合成した。すなわち、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-フルオレニルメトキシカルボニル)-アミノメチル)-フェノキシアセトアミド-エチル基を0.62ミリモル/g(樹脂)の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比：99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、Fmocアミドレジン〕0.1ミリモルを用い、目的とするペプチドのカルボキシル末端からアミノ末端に向かって順次対応するアミノ酸を結合させた。結合反応において、アミノ酸として、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N^γ-トリチル-L-グルタミン〔Fmocグルタミン〕、N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシン〔Fmocグリシン〕、N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-O-*t*-ブチル-L-トレオニン〔Fmocトレオニン〕、N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)- γ -ブチル-L-グルタミン酸〔Fmocグルタミン酸〕、N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N^ε-*t*-ブトキシカルボニル-L-リジン〔Fmocリジン〕、N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N^G-(2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルフォニル)-L-アルギニン〔Fmocアルギニン〕、N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-S-トリチル-L-システイン〔Fmocシステイン〕、N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-O-*t*-ブチル-L-セリン〔Fmocセリン〕、N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-ロイシン〔Fmocロイシン〕、N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N^{1m}-トリチル-L-ヒスチジン〔Fmocヒスチジン〕を、各結合ステップについてそれぞれ1ミリモルずつ用いた。

【0038】得られたペプチド樹脂を、7.5%のフェノールと、2.5%のエタンジチオール、5%の水と5%のチオアニソールを含むトリフルオロ酢酸10mlで3時間処理した。得られた溶液をジエチルエーテルに加えて生じる沈殿をさらに数回ジエチルエーテルで洗浄して、ペプチドの脱保護と樹脂からの脱離を行った。粗生成物をPD10カラム(アマシャムファルマシアジャパン)で精製してペプチドを得た。得られた精製ペプチドをファルマシアバイオテック株式会社製AKTAexp1

orer10XT [カラム：ミリポアウォーターズ株式会社製ノバパックC18 3.9mmφ×150mm、移動相：トリフルオロ酢酸を0.05容量%含有するアセトニトリルと水の混合溶媒(アセトニトリル濃度を30分間で5容量%から50容量%に直線的に変化させた)、流速1.0ml/min]に付したところ、8.6minに単一のピークが示された。FAB法マスペクトルにより求めた精製ペプチドの分子量は1579であった(理論値：1578.86)。

【0039】(実施例2)

式(2)：Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu(配列番号：2)で示されるアミノ酸配列を含むペプチドPhe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu-NH₂、および式(3)：Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu(配列番号：3)で示されるペプチドを実施例1と同様の方法で合成した。ただし、式(2)で示されるアミノ酸配列を含むペプチドの場合には、結合反応において、実施例1に示したアミノ酸以外に、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-γ-ブチル-L-グルタミン酸〔Fmocグルタミン酸〕、N^α-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-バリン〔Fmocバリン〕、N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-β-ブチル-L-アスパラギン酸〔Fmocアスパラギン酸〕、N^α-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-フェニルアラニン〔Fmocフェニルアラニン〕を、各結合ステップについてそれぞれ1ミリモルずつ用いた。式(3)で示されるペプチドの場合には、4-(N^α-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-ロイシン)-オキシメチル-フェ

ノキシメチル基を0.74ミリモル/g(樹脂)の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比：99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、HMPロイシン〕0.1ミリモルを用いた。

【0040】Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu-NH₂で示される精製ペプチドでは、14.3minに単一のピークが示され、精製ペプチドの分子量は1617であった(理論値：1616.86)。配列番号：3で示される精製ペプチドでは、12.9minに単一のピークが示され、精製ペプチドの分子量は1646であった(理論値：1645.96)。

【0041】(試験例1)24穴プレート(NUNC社)の各ウェルに、10%のウシ胎児血清を含むイーグル培地(10%FCS/E-MEM)に分散した5万個のL929細胞、または10%のウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地(10%FCS/D-MEM)に分散した5万個のNIH3T3細胞を、各1mlずつ分注した。37℃、5%CO₂下24時間培養して細胞を接着させた後、本発明のペプチドの、リン酸塩緩

衝(PBS：10mM、0.15Mの塩化ナトリウムを含む、pH7.4)溶液を100μlあるいは200μl、ならびにrhTNFα(R&Dシステムズ)またはrhTRAIL(R&Dシステムズ)またはrhFasL(R&Dシステムズ)のPBS溶液10μlを各ウェルに加えた。rhFasL(R&Dシステムズ)またはrhTRAILを用いる場合には、抗Hisタグ抗体(R&Dシステムズ)を最終濃度が10μg/mlになるように、さらに加えた。また、NIH3T3細胞を用いる場合には、さらにシクロヘキシミドを最終濃度が5μg/mlになるように加えた。37℃、5%CO₂下12時間培養した後、ヨウ化プロピディウム(PI)を培地中に最終濃度が1μg/mlになるように加え、さらに37℃、5%CO₂下15分間静置した。共焦点レーザー顕微鏡でPIの蛍光を観察し、アポトーシスに誘導された細胞を判別した。任意に選んだ5視野におけるアポトーシスに誘導された細胞と全細胞の割合を計算し、アポトーシス誘導率とした。

【0042】L929細胞に対してrhTNFαを50ng/ml用い、かつペプチド溶液の代わりにPBSを加えた時のアポトーシス誘導率が70.3%であるのに対し、His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Thr Gly Gln-NH₂のペプチドを最終濃度100μg/mlになるように加えた場合には50.7%、配列番号：3のペプチドを最終濃度100μg/mlになるように加えた場合には63.7%、Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu-NH₂のペプチドを最終濃度100μg/mlになるように加えた場合には65.6%であった。

【0043】同じく、L929細胞に対してrhTRAILを100ng/ml用い、かつペプチド溶液の代わりにPBSを加えた時のアポトーシス誘導率が55.4%であるのに対し、His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Thr Gly Gln-NH₂のペプチドを最終濃度200μg/mlになるように加えた場合には52.0%、Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu-NH₂のペプチドを最終濃度200μg/mlになるように加えた場合には46.6%であった。

【0044】NIH3T3細胞に対してrhFasLを100ng/ml用い、かつペプチド溶液の代わりにPBSを加えた時のアポトーシス誘導率が34.1%であるのに対し、His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Thr Gly Gln-NH₂のペプチドを最終濃度200μg/mlになるように加えた場合には29.9%、配列番号：3のペプチドを最終濃度200μg/mlになるように加えた場合には20.6%、Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu-NH₂のペプチドを最終濃度200μg/mlになるように加えた場合には25.1%であった。

【0045】

【発明の効果】上記の実施例から明らかなように、本発明により提供される新規なペプチドは、TNF、TRAIL、FasLが誘導するアポトーシス誘導を効果的に阻害できるので、これらが原因となる全身性エリテマトーデス、橋本病、慢性関節リウマチ、移植片対宿主病、シェーグレン症候群、悪性貧血、アジソン病、強皮症、グッドパスチャー症候群、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、自然不妊、重症筋無力症、多発性硬化症、バセドー病、特*

*発性血小板減少性紫斑病、インスリン依存性糖尿病などの自己免疫疾患；アレルギー；アトピー；動脈硬化症；心筋炎；心筋症；糸球体腎炎；再生不良性貧血；劇症肝炎、慢性肝炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎等の肝炎；AIDS；臓器移植後の拒絶反応；敗血症ショック；うっ血性心不全；脊髄異形成症候群；癌などの治療剤として有用である。

【0046】

SEQUENCE LISTING

<110> Foundation for Nara Institute of Science and Technology

<120> apoptosis-inhibited peptide

<130> 174097

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> human

<400> 1

His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys
Glu Thr Gly Gln

1 5 10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> human

<400> 2

Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser
Gly Glu Val Glu

1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> human

<400> 3

Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu

フロントページの続列 His Gly Leu

1 5 10

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード^{*} (参考)

// A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 39/395

N

39/395

D

A 6 1 P 1/16

A 6 1 P	1/16		3/10	
	3/10		7/00	
	7/00		7/06	
	7/06		9/00	
	9/00		9/04	
	9/04		9/10	1 0 1
	9/10	1 0 1	13/12	
	13/12		15/04	
	15/04		21/04	
	21/04		29/00	
	29/00			1 0 1
		1 0 1	35/00	
	35/00		37/04	
	37/04		37/06	
	37/06		37/08	
	37/08		43/00	
	43/00		A 6 1 K	37/02

F ター ム (参 考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
 DA05 DA08 DA13 DA14 DA15
 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA18
 CA59 NA14 ZA362 ZA452
 ZA752 ZB072 ZB082 ZB112
 ZB132 ZB152 ZC552 ZC802
 4C085 AA14 CC21
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA16 DA76
 DA86 EA22 EA28 EA50 FA34
 HA03

专利名称(译)	细胞凋亡抑制肽		
公开(公告)号	JP2002138099A	公开(公告)日	2002-05-14
申请号	JP2000328981	申请日	2000-10-27
申请(专利权)人(译)	财团法人奈良先端科学技术大学院大学支援财团		
[标]发明人	谷原正夫		
发明人	谷原 正夫		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P13/12 A61P15/04 A61P21/04 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K7/08 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K7/08.ZNA C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.A A61K39/395.N A61K39/395.D A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10.101 A61P13/12 A61P15/04 A61P21/04 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 A61K37/02 A61K38/00 A61K38/10		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA08 4B064/DA13 4B064/DA14 4B064/DA15 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA18 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA452 4C084/ZA752 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZC552 4C084/ZC802 4C085/AA14 4C085/CC21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/HA03		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 解决的问题: 提供对TNF等具有新的抑制活性的肽及其药学上可接受的盐, 以抑制由TNF等诱导的细胞凋亡和炎症, 以及用于治疗由其引起的疾病的肽。提供其药学上可接受的盐。人类的以下氨基酸序列: His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Thr Gly Gln (SEQ ID NO: 1) Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu (SEQ ID NO: 2) Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu (SEQ ID NO: 3) 或在氨基酸序列中添加了1~3个任意氨基酸的序列, 从氨基酸序列中缺失了1~3个氨基酸的序列, 或在氨基酸序列中被同源取代的序列。及其药学上可接受的盐, 其包含抑制凋亡或炎症诱导的肽。